# Società Italiana Agopuntura Veterinaria

# Laser-puntura nell'animale da laboratorio

Tesi di: Relatore:

Lorenzini Luca Dott. Maurizio Tomassini

## **INDICE**

# 1. INTRODUZIONE

- 1.1 FAQ in Agopuntura
- 1.2 Il Ricercatore "Occidentale"
- 1.3 Principi generali di laser-terapia

# 2. SCOPO DELLA RICERCA

# 3. INDIVIDUAZIONE DEI PUNTI DI AGOPUNTURA NEL RATTO ATTRAVERSO MISURE DI RESISTENZA ELETTRICA CUTANEA

- 3.1 Scelta dei punti
- 3.2 Procedura sperimentale
- 3.3 Risultati
- 3.4 Discussione

## 4. LASER-PUNTURA IN DUE MODELLI DI DOLORE ACUTO

- 4.1 Trattamento laser
- 4.2 Modelli Sperimentali
  - o 4.2.1 Infiammazione Acuta Plantare
  - o 4.2.2 Dolore miofasciale
- 4.3 Risultati
  - o 4.3.1 Infiammazione plantare
  - o 4.3.2 Dolore miofasciale

## 5. DISCUSSIONE

#### 1. INTRODUZIONE

A fronte di un sempre crescente interesse ed attenzione da parte del pubblico, la "medicina alternativa" resta sospesa tra lo scetticismo di molti, l'euforia di chi da anni la esercita, l'oggettiva soddisfazione di molti pazienti e la spinta di chi mira a sfruttarne solo le possibilità di guadagno. L'Agopuntura è oggi praticata in 129 paesi .Tradizionalmente, gli agopuntori tendono a porre l'accento sulla sua indiscutibile efficacia terapeutica (primo fra tutti il controllo del dolore) per molti stati patologici, sottolineandone come questa tecnica, se applicata in scienza e coscienza, si sia dimostrata priva di seri effetti collaterali.

La "evidence-based medicine", che rappresenta il paradigma della pratica medica e dei sistemi assistenziali occidentali, impone che i "consensus" diagnostici e terapeutici siano basati sull'evidenza scientifica (Mayer, 2004). Questo deve progressivamente investire le così dette "medicine alternative" o "complementari" e una serie di metodiche terapeutiche ampiamente utilizzate e raggruppate sotto il termine di "terapie fisiche" ma per le quali mancano dati scientifici definitivi su efficacia e meccanismo d'azione. Ed è proprio in questo senso che hanno operato agenzie ed enti deputati quali National Institute of Health (NIH), Food and Drug Administration (FDA), Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), esortando ad incrementare la sperimentazione scientifica su questi topics. Infatti, nonostante l'impegno di molti ricercatori e scienziati, attenti studi morfologici e gli importanti passi in avanti compiuti grazie agli studi sugli oppioidi endogeni ed all'avvento dell'Imaging Funzionale, nessuno, alla luce di incontrovertibili successi clinici, è riuscito a dare una spiegazione univoca sui meccanismi d'azione su cui trovano fondamento queste pratiche.

# 1.1 FAQ in Agopuntura

Credo sia opportuno fare il punto su alcune delle più frequenti domande a cui si deve solitamente rispondere quando ci si confronta con un gruppo di scettici in materia di Agopuntura:

- 1) Dove "sono" i meridiani energetici?
- 2) Cosa succede nell'organismo al momento della inserzione dell'ago?
- 3) Come è possibile che un ago posto a livello di braccio o di piede curi patologie in tutt'altro distretto?
- 1) Ogni agopuntore sa bene che dissezionando un organismo, non sarà mai possibile isolare dei canali energetici intesi come cavità anatomiche deputate al passaggio delle energie. Questo è molto ovvio.

Tuttavia è doveroso ricordare un esperimento teso a dimostrare l'assunto base di questa antica pratica cinese, ovvero l'esistenza dei meridiani energetici, condotto da de Vernejoul e coll. (de Vernejoul et al., 1992) presso l'ospedale Necker di Parigi. In questo lavoro si osserva, tramite una camera a scintillazione, il cammino in trecento soggetti lungo la gamba, il ginocchio e coscia, di piccole quantità di un isotopo radioattivo (Tecnezio 99) iniettate in un punto di agopuntura nel piede.

Questo isotopo durante il suo tragitto seguiva percorsi non riferibili con certezza né a strutture anatomiche nervose né emo-linfatiche. Aggiungiamo che questa migrazione non variava da un soggetto all'altro. Inoltre in un primo esperimento la sostanza radioattiva è stata iniettata al di fuori del punto di agopuntura. Nessuna migrazione si è riscontrata a partire da questo punto (de Vernejoul et al., 1992).

Sulla base di ricerche elettromiografiche è stato dimostrato che i punti di un meridiano si trovano sul percorso di catene muscolo tendinee cineticamente unite e che anche in movimenti combinati abbastanza semplici (esempio la semplice distensione di un braccio) si eleva sempre la frequenza dei potenziali muscolari dell'intera catena, anche dei muscoli apparentemente non coinvolti. È emerso inoltre che i movimenti respiratori sono osservabili, mediante misurazioni obbiettive elettromiografiche, anche nell'attività della muscolatura delle cosce e degli avambracci. Questo fornirebbe una base morfologica funzionale anche alla circolazione dei meridiani (Bergsman and Wooley-Hart, 1973; Lo, 2002).

Più recentemente è stato ipotizzato che i meridiani non siano strutture anatomicamente e chimicamente distinte, ma siano composte dagli stessi substrati molecolari che compongono il tessuto adiacente. Le molecole che si trovano nei meridiani sarebbero però polarizzate e raggruppate a formare clusters (Lo, 2002). È verosimile che le molecole di acqua, di cui è straordinariamente ricco il sottocute, lì dove polarizzate, si radunino a formare clusters di acqua con dipolo elettrico: questi clusters allineati formerebbero un meridiano. Un'altra ipotesi suggerisce che lo spazio perivascolare rappresenti un possibile substrato anatomico dei meridiani (Ma et al., 2003).

2) La scienza occidentale tende a spiegare i risultati conseguiti dalla millenaria pratica degli aghi attraverso le cognizioni della moderna riflessoterapia, per la quale i nervi rachidiani seguono una precisa organizzazione somato-topica (i cosidetti metameri) facilitando in tal modo la proiezione cutanea dei treni di impulsi, secondo i vari piani del sistema neuro-endocrino-immunologico. È stato ampiamente dimostrato che con l'agopuntura si provoca una stimolazione di recettori nervosi e si agisce direttamente su terminazioni libere di fibre nervose (Chusid, 1982; Heine, 1988; Li et al., 2004). A riprova di ciò ad esempio, non si osserva nessun

effetto antiemetico se il punto antiemetico PC6 è stato pretrattato con un anestetico locale (Dundee and Ghaly, 1991).

Diversi studi effettuati in numerosi centri di ricerca hanno messo in evidenza come tramite la tecnica agopunturale venga soppressa o ridotta notevolmente la componente nocicettiva del riflesso, mentre rimane inalterata la componente propriocettiva. È possibile affermare quindi che il sistema nervoso periferico e centrale e lo stato funzionale della corteccia giocano un ruolo principale nel meccanismo d'azione dell'agopuntura. Lo stato funzionale della corteccia che è una componente variabile nell'individuo potrebbe spiegare la forte variabilità degli effetti dell'agopuntura (Chusid, 1982; Heine, 1988; Cai, 1992).

Nell'agopuntura spesso il medico agisce a distanza su di un organo che non è in relazione diretta o topografica con la zona dove si applica la terapia.

Secondo la riflessologia è attraverso il sistema nervoso nel senso più largo che si instaurano dei circuiti terapeutici, ma l'azione finale può essere anche vascolare o umorale.

Quindi, un punto chiave di tutte le riflesso terapie è il ruolo dell'elemento periferico (agopunto) come origine o terminazione dell'arco riflesso interessato: l'agopunto ha dimensioni molto variabili nell'ordine del millimetro. Spesso non presenta caratteri visibili eccetto una piccola depressione, una piccola cupola, un eritema spontaneo. Possono risultare algici. Il dolore può essere spontaneo o provocato, acuto o localizzato, sordo e diffuso, superficiale o profondo. Inoltre i rivelatori di agopunti sfruttano una ulteriore caratteristica; le variazioni della resistenza elettrica o dell'impedenza cutanea evidenziabili a livello di agopunti.

Più interessante è valutare come in relazione alla profondità di infissione dell'ago e all'intensità e alla forma della stimolazione, diversi elementi possano essere interessati.

Se l'ago è infisso superficialmente, sono interessati i recettori superficiali e la rete di fibre nervose quasi tutte amieliniche (Kenins, 1981). Il numero degli elementi stimolati è anch'esso importante: infatti l'ago, anche se di dimensioni minime, interessa un numero notevole di meccano-recettori ed il micro-trauma che consegue all'infissione interesserà i tessuti fino alla distanza dell'ordine dei mm; inoltre l'azione dell'ago mediante un meccanismo ionico, potrebbe agire sulle sinapsi locali e distanti, responsabili di una risposta progressiva e diffusa, realizzando così una atmosfera sinaptica. Quando l'ago è infisso profondamente, obliquamente o verticalmente, oltre agli elementi superficiali, interesserà anche i recettori profondi e differenti elementi nervosi (Heine, 1988; Cai, 1992).

La ricerca di caratteristiche anatomiche dei punti di agopuntura, ha portato a identificare in queste aree una innervazione simpatica cinque volte superiore alle zone adiacenti, associate ad una particolare eccitabilità muscolo-cutanea. (Heine, 1988; Li et al, 2004).

I punti di agopuntura sembrano essere caratterizzati da una precisa struttura anatomica, il cosidetto fascio neurovascolare, il quale è avvolto da una guaina connettiva e contiene una vena grossa ed una piccola, una arteria di piccolo calibro, un vaso linfatico, terminazioni nervose, corpi del Pacini e di Meissner, epidermide e tessuto connettivo subepiteliare(He, 1987; Lu, 1983; Takeshige et al., 1993). In più nei punti di agopuntura, l'innervazione simpatica vascolare sembra essere 5 volte più densa che nelle adiacenti aree non di agopuntura (Bossy, 1984; He, 1987) producendo specifici effetti simpatici(Ernst and Lee, 1986). In questi punti vi è una caduta delle resistenze elettriche (Lubart et al., 1990). Dal momento che i punti di agopuntura sono strategici conduttori di segnali elettromagnetici (Dale, 1997; Takeshige and Sato, 1996), la stimolazione di punti lungo questi percorsi attraverso l'agopuntura permette il rilascio in quantità maggiore di

segnali elettromagnetici rispetto alle condizioni normali. Questi segnali possono far partire il flusso di inibitori biochimici del dolore come endorfine e serotonina (Heine, 1988).

Qualunque sia la via d'azione, i meccanismi della stimolazione periferica possono essere considerati secondo le seguenti modalità (Roccia e Panichi, 1978):

- A) L'ago può interessare diversi meccanocettori (nocicettori specifici o non specifici) sia direttamente, sia mediante la trama connettiva dermica.
- B) Può agire mediante un meccanismo ionico sul meccanismo di traduzione e sui fenomeni della traduzione sinaptica.
- C) Quando interessa direttamente un tronco nervoso o quando l'ago è posto parallelamente a questo, vi sarà un interessamento sulla conduzione dell'influsso nervoso mediante un processo di ionizzazione, di modificazione di campo elettrico.
- D) L'azione differente ottenuta dal senso di rotazione degli aghi può trovare la spiegazione per la presenza di recettori sensibili agli spostamenti dell'ago; la rotazione di un ago in un senso può eccitare uno o più recettori di questo tipo, la rotazione in senso inverso non ecciterà questi recettori ma ne metterà in movimento altri.

Un grande impulso alla spiegazione dell'efficacia dell'agopuntura attraverso le teorie riflessologiche è venuto negli anni recenti dall'impiego di tecniche di imaging cerebrale, che hanno portato ad esempio, a dimostrare nell'uomo, l'esistenza di correlazioni tra l'attivazione di specifiche aree cerebrali e l'effetto analgesico indotto dalla stimolazione elettrica degli agopunti con bassa o alta frequenza (Zhang et al, 2003); a formulare mappe correlative tra gli agopunti e la "neuromatrice" delle vie del dolore (Wu et al, 2002); o nel caso dell'impiego dell' agopuntura non a fini antalgici, di confermare l'esistenza di correlazioni tra specifiche aree

corticali di proiezione somatica e/o viscerale con gli agopunti specifici definiti dalla medicina tradizionale cinese (Cho et al, 1998; Li et al 2004), o ancora: la correlazione tra attivazione di aree corticali, rotazione e senso di rotazione degli aghi (Fang et al, 2004).

3) Ma come è possibile che stimolando con l'ago un preciso punto della cute si possa giovare non solo a una zona di contrazione e di dolore dell'apparato muscolo scheletrico ma anche, ad esempio, per contrastare una patologia dell'albero bronchiale o della parete dello stomaco o della funzione renale?

A questo proposito è da citare la cosidetta ipotesi embriogenetica. Poiché, sia la cute che il sistema nervoso derivano da uno stesso foglietto embrionario, tutti i cosidetti meridiani (o percorsi, che il medico stimola) potrebbero essere determinati da uno stesso sviluppo embriogenetico. Se ad un primo stadio della formazione dell'uovo un tale punto dell'ectoderma (che in nove mesi diventerà sistema tegumentario e sistema nervoso) viene a trovarsi in rapporto intimo con un punto dell'entoderma (dal quale deriveranno gli organi), si può presumere che nel corso dello sviluppo gli stessi intimi rapporti persistano tra questo organo e la cute con l'intermediazione del sistema nervoso. Di conseguenza quel punto della cute continuerà a rappresentare la proiezione nervosa dell'organo in questione (Roccia e Panichi, 1978).

A sostegno di tale ipotesi, possono essere ricordati alcuni lavori volti a spiegare il fenomeno del dolore viscerale riferito a specifici e talora distanti distretti cutanei e il concetto della convergenza-divergenza di segnali nervosi rispetto al singolo neurone (Giamberardino, 2003).

Tuttavia, se è vero che per alcuni dei meridiani suggeriti dalla pratica esiste una corrispondenza con l'innervazione della regione anatomica, entro la quale quelle ramificazioni esercitano la loro funzione, per altri tale relazione non è per il momento constatabile.

La cute, insomma, rappresenterebbe, anche in questo caso, il filtro fra l'interno e l'esterno del nostro organismo. L'unione embriologica della cute con il sistema nervoso farebbe scaturire importanti conseguenze, quali la convergenza su uno stesso neurone d'associazione del midollo spinale (a livello del quale si verificano, com'è noto, fenomeni d'integrazione, di sommazione, d'inibizione, e di eccitazione) di numerosi stimoli d'origine superficiale e profonda.

Al punto in cui siamo e dopo i recenti ufficiali riconoscimenti del mondo scientifico è auspicabile che i risultati terapeutici (il dolore cronico dell'apparato muscolo-scheletrico, alcune patologie dell'apparato respiratorio, certe turbe di ordine neurologico) vadano studiati con sempre maggiore attenzione, secondo i metodi correnti d'indagine e partendo dalla semplice osservazione che è possibile stabilire l'attività elettrico-nervosa del punto cutaneo sul quale viene inserito l'ago.

Ogni stimolazione di un punto di agopuntura porta a delle variazioni dei potenziali di corrente quindi ad un fenomeno di eccitazione da parte del plesso vaso-motore e dei nocicettori polimodali con conseguente ripercussione sui potenziali elettrici sia nello spazio extracellulare che delle membrane cellulari. Le intensità di campo risultanti dai potenziali elettrici provocano spostamenti di cariche e migrazione di ioni nel sistema fondamentale, determinandone quindi la funzionalità (Lee and Beitz, 1993).

Un aspetto importante di cui tenere conto è il cortocircuito che si stabilisce al momento dell'infissione di un ago tra questo e la sostanza fondamentale. L'agopunto visto quindi come trasduttore meccano-elettro-biochimico reagisce in un primo momento autonomamente, al livello più periferico

della elaborazione neurale dell'informazione, cioè attraverso il riflesso assonico. L'eccitazione fisiologica dei nocicettori del punto di agopuntura dà luogo ad una conduzione eccitatoria che già alla prima diramazione laterale degli assoni diventa antidromica tornando verso la periferia.

Al riflesso vasomotorio poi si associa una risposta di modifica dello stato della sostanza fondamentale nel distretto interessato, con una alterazione del suo stato di perfusione e di turgore. L'aumentato rilascio di Sostanza P (SP) e calcitonin gene related peptide (CGRP) come funzione effettrice da parte di assoni induce una vasodilatazione e la degranulazione di mastociti (Kashiba and Ueda, 1991; Wyon et al., 1998). Si liberano così i mediatori proinfiammatori (IL-1, IL-2, IL-6, istamina, prostaglandine, leucotrieni, ecc.) che eccitano altri assoni, per cui si determina una considerevole autoamplificazione del riflesso assonico oppure del relativo complesso di riflessi segmentali (metamerici) (Cheng et al., 1997; Yu et al., 1997; Jeong et al., 2003). Perdurando la eccitazione del punto di agopuntura vengono attivati altri centri nervosi superiori. Aumenta così la liberazione riflessa di neuropeptidi e mediatori dagli assoni terminali sensibili con conseguente Si degranulazione dei mastociti. crea quindi una condizione preinfiammatoria che può evolvere in una infiammazione neurogena e i punti risulteranno sempre più dolorosi. Anche nei corni posteriori del midollo spinale si ha la liberazione di SP e CGRP dalle terminazioni centrali dei neuroni dei gangli spinali. In risposta vengono promossi processi di sintesi di neurotrasmettitori inibitori spinali e sovraspinali come oppioidi, serotonina (Kaada and Eielsen, 1983), GABA e noradrenalina.

Questi meccanismi cellulari e molecolari sono gli stessi evocati dagli stimoli nocicettivi. In particolare, dall'osservazione che la stimolazione dei neuroni sensitivi produceva vasodilatazione, fuoriuscita di plasma dai capillari ed ipersensitività, si è giunti oggi a formulare il concetto di

"neurobiologia della cute", a sottolineare come la cute possa rappresentare sede di integrazione fra sistema nervoso centrale, periferico, sistema endocrino, immunitario, cellule cutanee endoteliari, fibroblasti, alla quale partecipano classi di molecole diverse quali neurotrasmettitori, peptici, fattori di crescita, citochine.( Steinhoff et al. 2003; Richardson and Vasko, 2002; Schmela and Peterson, 2001).

L'agopuntura agirebbe anche a livello del sistema nervoso autonomo (simpatico e parasimpatico) che, com'è noto presiede all'attività di molti apparati: sul respiratorio controllando il tono dell'albero bronchiale; sul digerente mediante il controllo della secrezione ghiandolare e della motilità gastrointestinale; sul vascolare attraverso l'attività contrattile della muscolatura della parete dei vasi arteriosi e venosi; sul sistema tegumentario, sul drenaggio renale etc.

La stimolazione di precise localizzazioni, a livello delle quali i principali tronchi nervosi emergono in superficie, permetterebbe dunque di trasmettere un segnale dalla periferia al sistema nervoso centrale, lungo le fibre spino-talamiche per la sensibilità dolorifica, tattile o termica, per quanto riguarda la terapia del dolore; lungo altre vie per ora non conosciute, per quanto concerne la terapia di altri disturbi.

Fra i possibili impieghi terapeutici dell'agopuntura l'effetto principale è sicuramente quello analgesico: studi condotti sulla misurazione della soglia del dolore effettuati in diversi istituti di ricerca concordano tutti in un effettivo innalzamento della soglia del dolore sotto stimolo dei punti di agopuntura (Han et al., 1980; He, 1987; Takeshige, 1989; Ezzo et al., 2000; Hao et al., 2000; Biella et al., 2001; Nayak et al., 2001).

Un fondamentale contributo nel definire il ruolo antalgico dell'agopuntura anche secondo i criteri della medicina occidentale è venuto dallo studio dei peptici oppioidi endogeni. Fin dalla loro scoperta infattinegli anni '70, sono

iniziati studi volti ad associare agopuntura e modificazione dei livelli di  $\beta$ endorfina, encefalica e dinorfina (Han, 2004), fino ad arrivare all'ipotesi
che esista nell'elettro agopuntura un rilascio di oppioidi endogeni
dipendente dalla frequenza di stimolazione periferica, mediata da vie
anatomiche centrali distinte (via ipotalamo per le basse frequenze, via
ponte per le alte) (Han, 2003).

Clinicamente si è potuto constatare l'efficacia dell'agopuntura sugli stati di ipereccitabilità e nel trattamento dell'insonnia nell'uomo. Lo studio degli E.E.G. ha potuto dimostrare, in adulti normali ed in animali, l'azione sedativa di questa terapia con la presenza di onde alfa che aumentano di ampiezza, durante la stimolazione dell'ago.

Effetto antinfiammatorio: numerose ricerche di laboratorio hanno constatato come la stimolazione di alcuni punti porti ad un aumento della leucocitosi presente in stati infiammatori di diversa origine ed un aumento dei neutrofili e del potere fagocitario dei leucociti, mentre contemporaneamente aumentano le gamma e le beta globuline.

Effetto di equilibrio di funzioni: la stimolazione di certi punti agisce su sintomi opposti. Ad esempio Tsu-san-li (St36) agisce sia sulla diarrea che sulla stipsi, correggendole. Così pure altri punti agiscono sia sull'ipertensione che sull'ipotensione, regolarizzandole.

Le osservazioni di carattere neurologico e le statistiche dei risultati terapeutici, meritano oggi un'attenzione diversa rispetto al passato; specie per quanto riguarda la neuro-stimolazione percutanea nella terapia del dolore.

Quest'ultima è certamente la più studiata fra le applicazioni dell'agopuntura ma essa non esaurisce le sue possibilità: sarebbe, a dire degli esperti, come ridurre la chirurgia all'asportazione degli ascessi. Si osservano invece sorprendenti risultati nei confronti delle patologie

allergiche (rinite, asma, dermatosi), delle forme infiammatorie a carico di alcune mucose (sinusiti, gastriti, bronchiti). Buoni risultati si ottengono anche per alcune turbe del sistema nervoso (insonnie, cefalee, anoressie, amenorree, depressioni, impotenza, tabagismo) e a favore dell'apparato vascolare, come l'ipertensione arteriosa moderata (Maciocia, 1995).

#### 1.2 Il Ricercatore "Occidentale"

Un ricercatore che si approccia all'agopuntura e ne cerca una validazione sfruttando le armi a sua disposizione, dovrà fin dai primi passi interfacciarsi con alcuni problemi tecnici e non solo.

La prima difficoltà a cui dovrà fare fronte sarà il come integrare i fondamentali concetti della Medicina Cinese con le regole della sperimentazione scientifica: la necessità di lavorare con gruppi di animali omogenei per età, sesso, specie. Animali stabulati in condizioni standard che quasi sempre mostrano comportamenti analoghi e lontani dai loro simili selvatici, animali abituati a non confrontarsi mai con situazioni diverse dalle soliti se non in sede di esperimento. Trattamenti uguali per tutti che non possono essere disegnati ad hoc sul paziente ma rispondere alle esigenze di uniformità del gruppo sperimentale. Scelta di modelli di malattia compatibili con il tipo di applicazione terapeutica che si stà per testare per evitare risultati scontati o influenzati dalla inadeguatezza delle procedure.

Anche al momento della ricerca bibliografica antecedente alla sperimentazione, un ricercatore dovrà probabilmente far fronte ad un secondo problema: spesso nella ricchissima letteratura presente in rete, si deve riscontrare la frequente mancanza di molti importanti dettagli metodologici che avendo effetti negativi sulla riproducibilità e ripetibilità

dei dati ottenuti, hanno sicuramente contribuito ad una immagine confusa sull'efficacia dell'agopuntura. Tipo di stimolazione, tempi, ripetizioni dei test, posizionamento degli aghi, orari, dati di controllo.

Questo non certo per criticare il lavoro di ben più validi ricercatori, ma per sottolineare come a volte riuscire a dare continuità, o semplicemente confermare e rinforzare concetti già testati, o ancora più importante, potere iniziare da dove altri avevano finito, può diventare assai problematico, obbligando ad investire forze e risorse dove si sperava non fosse più necessario.

Altro aspetto spesso criticato, è la percentuale di efficacia dell'agopuntura riscontrato nella letteratura internazionale, specialmente nelle riviste di settore, che in molti casi sfiora il 100%. Il tutto poi smentito e vilipeso da review o studi controllati che distruggono quanto di buono fatto.

Sicuramente di fronte ad alcuni "miracoli" anche un entusiasta ottimista è portato a farsi alcune domande sulla inattaccabilità di quei risultati! È altresì vero che, a mio modesto parere, a volte si siano poste delle critiche più per distruggere che non per costruire.

Bisogna inoltre, a mio avviso, sottolineare un ulteriore aspetto: la storia della ricerca scientifica su questi temi.

Molta attenzione è stata posta alla morfologia del punto da stimolare ed alla spiegazione biochimica dei processi alla base dell'efficacia terapeutica. Poco riscontro è stato dato al concetto più importante della Medicina Cinese, ovvero come la salute possa essere la conseguenza di un equilibrio di energie. Parlare di energia fino a pochi anni fà era un privilegio riservato in buona parte agli "stregoni" ed ironizzato da buona arte della comunità scientifica.

Sicuramente i nuovi scenari aperti dalla Biofisica e dalla attenzione sempre crescente verso i meccanismi di interazione tra forze fisiche e substrati

biologici (campi elettromagnetici, onde d'urto, laser, ultrasuoni, etc) potrebbe aprire una stagione molto interessante e feconda anche per la ricerca di base sui meccanismi alla base della MTC, rivolti non più allo studio puramente biochimico, ma per l'appunto biofisico, e non unicamente concentrato sui meccanismi intracellulari ma che coinvolgano l'intera matrice extracellulare (MEC) come importante vettore di informazioni, segnali, ed energia! Proprio la MEC infatti inizia ad essere vista non solo come veicolo delle energie fisiche utilizzate a scopo terapeutico, ma anche come buffer di trasferimento delle medesime alla componente cellulare.

# 1.3 Principi generali di laser-terapia

Laser è l'acronimo di Light Amplification Stimulated Emission of Radiation. Il funzionamento di un dispositivo laser si basa su un flash che emette una radiazione visibile o prossima al visibile e su una barra di cristallo o di un tubo a gas, limitati alle estremità da due specchi, l'uno totalmente riflettente e l'altro parzialmente riflettente contenenti opportuni atomi che permettano di amplificare le radiazioni del flash, ottenendone una estremamente concentrata, monocromatica, coerente.

Per definizione un laser è "qualunque dispositivo che produce ed amplifica la radiazione elettromagnetica in un range di lunghezza d'onda compresa tra 180nm e 1mm attraverso un processo di emissione stimolata controllata" (European Standard IEC 601).

Il Sole, un fuoco, una lampada, sono tutti esempi di sorgenti di radiazione elettromagnetica visibile. In queste fonti luminose "tradizionali" ciascun atomo si comporta a sua volta da sorgente indipendente; i fotoni vengono così prodotti da salti energetici diversi (e quindi con frequenze diverse) e

senza relazione di fase. È possibile generare un raggio luminoso coerente e monocromatico e questo è alla base del funzionamento del laser.

Nelle sostanze ordinarie, la massima parte degli elettroni si trova nello stato fondamentale e quando la luce incide su tali sostanze, si ha una emissione stimolata molto limitata, in quanto la massima parte dell'energia viene usata per muovere gli elettroni dallo stato elementare a quello eccitato. Perchè si possa avere una amplificazione dello stato di diseccitazione, è necessario prima produrre un'inversione nella popolazione elettronica, di modo che si trovino più elettroni sullo stato eccitato che in quello fondamentale.

Sappiamo che in un mezzo invertito gli atomi eccitati decadono spontaneamente in livelli meno energetici emettendo fotoni di determinata lunghezza d'onda pari a 694,3mm. Questi fotoni possono interagire con una molecola eccitata in uno stato metastabile facendogli emettere un secondo fotone innescando così una reazione a valanga di emissione luminosa stimolata (Duncan, 1998).

Ma due fasci generati da decadimenti atomici distinti non hanno fase e direzione comune, nonostante siano singolarmente monocromatici, coerenti e direzionati; questi impulsi si propagano lungo direzioni casuali e sono reciprocamente incoerenti. Il "trucco" che consente di ottenere da un mezzo invertito un laser vero e proprio consiste nel confinare il mezzo all'interno di un risonatore ottico. Di tutti i fotoni emessi spontaneamente, ed eventualmente amplificati, l'unico che non verrà assorbito dalle pareti sarà quello che si propaga ortogonalmente ai due specchi. Questo continuerà a riflettersi e quindi a moltiplicarsi all'interno del mezzo attivo. Il fascio così generato è composto da fotoni identici a quello di partenza e quindi monocromatico e coerente.

La tecnologia laser ha trovato da subito ampie applicazioni in campo biomedico (Tuner and Hode, 2002). I laser usati in medicina appartengono a due categorie: Laser chirurgici e Laser terapeutici.

I primi sono dotati di un'energia capace di scaldare i tessuti oltre i 50°C. Possono essere usati sia in modo continuo che pulsato. Laser di questa potenza non hanno proprietà terapeutiche, essendo la loro emisione troppo potente e distruttiva. I Laser chirurgici possono a loro volta essere divisi in 3 gruppi relativamente alla loro potenza: vaporising (1-5W), light cutting (5-20W), deep cutting (20-100W).

I laser ad uso terapeutico quindi sono definiti tutti "low" o "very low".

L'impiego di laser di basso livello o energia (vLLLT, very low level laser therapy), introdotto oltre 30 anni fa come trattamento ad esempio di artrite reumatoide, osteoartrite e per facilitare la guarigione di ferite dei tessuti molli, offre risultati ancora molto controversi. I trattamenti iniziali venivano eseguiti con esposizioni estremamente basse (da <1 a 5 mW), successivamente portate a livelli compresi fra 30 e 90 mW usando un segnale all'infrarosso.

La meta-analisi retrospettiva curata sul database Cochrane per l'impiego della vLLLT in artrite reumatoide, osteoartrite e disordini meccanici del collo, nel sottolineare la eterogenicità degli studi e il numero limitato di quelli controllati e utilizzabili, diversi per lunghezza d'onda, criteri di modulazione del segnale, durata del trattamento, dose e sede di applicazione, non fornisce indicazioni definitive sulla sua efficacia terapeutica (Brosseau et al., 2000; 2004).

Pochi sono poi, nella letteratura scientifica occidentale gli studi mirati a comprendere l'interfaccia biologica fra segnali energeticamente molto blandi applicati sulla cute ed eventuali effetti positivi descritti clinicamente anche a distanza.

L'esposizione di tessuti all'emisione laser produce comunque significative variazioni del metabolismo cellulare fra le quali si devono menzionare (Tuner and Hode, 2002):

- l'accelerata sintesi dell'ATP, che indicherebbe l'idoneità dell'emissione a "rifornire" di energia la cellula
- l'aumentata efficenza delle pompe cellulari Calcio, Sodio, Potassio, che esprimerebbero una accelerazione del metabolismo cellulare.

La scelta della frequenza di emissione (il "colore" della luce) può essere determinata in base alla "trasparenza" dei principali componenti dei tessuti: l'acqua e l'emoglobina. Ne consegue che le lunghezze d'onda più interessanti per l'impiego in medicina si troverebbero comprese tra 550 e 850 nm.

Il trattamento di laser terapia si basa quindi sugli effetti fotochimici e fotobiologici su cellule e tessuti. La sua applicazione su tessuti biologici porta a dei fenomeni sia locali che sistemici. È stato dimostrato che a seguito di irraggiamento con una giusta dose alcune funzioni cellulari vengono stimolate e questo è particolarmente vero per cellule che abbiano subito un danno. Incremento del metabolismo cellulare e della sintesi di collagene nei fibroblasti, aumento del potenziale d'azione delle cellule nervose, stimolazione alla produzione di DNA e RNA nei nuclei cellulari, effetti locali sul sistema immunitario, aumento dell'angiogenesi per la liberazione di Growth factor, aumento dell'attività dei leucociti, trasformazione di fibroblasti in miofibroblasti, etc, sono effetti biologici descritti a seguito dell'applicazione laser su sistemi biologici in vitro (Vo-Dinh, 2003).

Esistono tuttavia anche degli effetti sistemici, ben illustrati da esperimenti effettuati con laser a CO<sub>2</sub>, il cui potere di penetrazione non va oltre il millimetro, ma il cui effetto a seguito della stimolazione non è stato

differente da quelli ottenuti con laser piu penetranti (Tuner and Hode, 2002).

Questo fa pensare che la profondità di penetrazione del fascio non sia di per se la condizione fondamentale per avere una biostimolazione.

Una possibile spiegazione viene dalla possibilità che la luce induca alla produzione di sostanze poi messe in circolo attraverso il sistema emolinfatico.

Se l'energia laser viene assorbita, dovranno esserci dei recettori.

"A tutt'oggi sono stati identificati sia in organismi procarioti che eucarioti, più di trecento proteine fotochimicamente reattive, capaci di captare bassissime energie. Negli uomini i più comunemente conosciuti recettori fotochimicamente attivi sono i pigmenti nei coni e nei bastoncelli dell'occhio. Tuttavia molti altri sono stati scoperti negli ultimi anni. Per esempio ci sono delle encephalopsine nel cervello e pinopsine nella ghiandola pineale: la scoperta di proteine fotorecettrici a livello di ghiandola pineale, di ipotalamo e altri tessuti di piccoli vertebrati, induce a ritenere che sia solo una questione di tempo la scoperta di simili strutture nei mammiferi compresa la specie umana." (Enwemeka, 2001).

In letteratura l'uso del laser terapeutico è ampiamente descritto in molti campi applicativi, alternando scetticismo, bocciature ma anche molti pareri positivi o addirittua entusiastici. Tuttavia neppure in campo veterinario la ricerca ha dissipato le lacune e le controversie riscontrate in medicina Umana.

E' interessante a tal proposito riportare l'opinione di Jan Tuner e Lars Hode a riguardo dell'applicazione del laser in veterinaria, tratta dal loro libro "Laser Therapy- clinical Practice and scientific Background" (2002), considerato il miglior testo del settore.

"Durante gli anni 80 cacciatori di fortuna e venditori senza scrupoli hanno gettato fango sul trattamento laser nel Trottatore. Non è il laser ad avere fallito, bensì la colpa è da attribuire alla incapacità di chi lo ha usato ed alla inadeguatezza delle apparecchiature.

I cavalli sono molto più sensibili di un uomo alla stimolazione laser. Spesso sono stati trattati cavalli con laser a penetrazione troppo elevata ( e sopratutto super-pulsed laser), provocando una reazione (anche dolorosa) quando la luce entrava in zone troppo vicine al danno o all'area del problema. Questo è particolarmente vero per i GaAs laser. Se il cavallo reagisce in modo eccessivo, è consigliabile prima trattarlo con laser pulsati a bassa energia prima di passare a trattamenti più energici. Inoltre questa sensibilità del cavallo può essere utilizzata anche per la localizzazione di un problema. Nei trottatori e nei cavalli sportivi in genere, chi usa laser terapia con cognizione di causa ed una attrezzatura adeguata è entusiasta dei risultati clinici ottenuti. Gli incentivi economici sono ovvi.

Anche cani e gatti (e i loro cuccioli) sono stati trattati con laser con buoni risultati.

Un problema comune, anche ad altri trattamenti sui cavalli, connesso agli interessi economici, è legato al fatto che il trattamento laser può radicalmente alleviare il dolore dopo una o due applicazioni. Persone senza esperienza medica possono in seguito alla scomparsa del dolore far riprendere l'allenamento all'animale in modo troppo intenso portando ad una degenerazione del problema anzichè ad una sua completa risoluzione.

Questo però purtroppo capita anche con gli atleti umani!

Un'altra attenzione da porre nei confronti dei nostri animali prima di effettuare un trattamento laser è legato al fatto che il loro pelo è pressochè impenetrabile alla luce (si parla di 50% fino a 99% di luce schermata dai peli e pelli scure). Gli effetti negativi della presenza del pelo

sull'assorbimento della luce possono essere ovviate procedendo ad una rasatura della parte che si vuole irradiare oppure utilizzando apparecchiature che tengano in considerazione questa variante.

Sfortunatamente molti degli strumenti utilizzati dai veterinari sono di elezione umana e spesso questo motivo tecnico porta ad avere sugli animali trattati dei risultati dubbi."

#### 2. SCOPO DELLA RICERCA

L'agopuntura con laser viene considerata dai sostenitori della laser-terapia una delle più eccitanti aree operative per questo tipo di applicazioni aprendo una innumerovole possibilità di applicazione per un agopuntore. Il metodo è sterile e non doloroso quindi meglio accettato dai pazienti in particolar modo bambini. In realtà, dati sperimentali sostengono la possibilità di ottenere effetti sistemici con la stimolazione dei punti di punti di agopuntura non attraverso l'applicazione dell'ago ma utilizzando ad esempio la stimolazione elettrica transcutanea (Wang et al., 1992), l'iniezione di veleno d'ape (Kwon et al., 2001), l'agopuntura elettrica (Ceccherelli et al., 1996; Kwon et al., 2001), chiaramente applicate ai punti di agopuntura. Questo risulta essere efficace nel ridurre il dolore e l'edema successivi ad un'infiammazione acute o all'artrite.

Sia l'agopuntura con laser che quella con aghi utilizzano gli stessi punti. Tuttavia, in accordo con l'esperienza dei terapisti non danno come risultato lo stesso effetto. Si puo dire che si complementino l'un l'altro.

I pionieri della laser-agopuntura sono stati ancora una volta i cinesi a partire dal 1971 per anestesie per estrazione dentarie ed operazioni di piccola entità.

Questo lavoro è realizzato nell'ambito di una studio relativo a un dispositivo laser a bassissima energia, con onda pulsata (Giuliani et al., 2003). Questo strumento è risultato efficace, in studi clinici controllati, per la riduzione del dolore (Monteforte et al., 2003) ed edema sottocutaneo (Baratto et al., 2000) in corso di osteoartrite.

# Scopi della ricerca sono:

1)Trovare una tecnica di standardizzazione della procedura agopunturale su ratto che permetta una ripetibilità e standardizzazione dei risultati ottenuti.

2)Trovare conferma dell'efficacia dell'applicazione di un laser pulsato a bassissima energia nel controllo di edema e dolore in modelli animali di infiammazione acuta. Sono stati usati il modello dell'infiammazione acuta da carragenina dell'arto posteriore e il modello di dolore miofasciale da carragenina nei tricipiti brachiali, indotta nel ratto. La stimolazione laser è stata eseguita su punti di agopuntura. Il ratto ben si presta a questo tipo di studio, essendo un animale che se correttamente usato, non presenta "effetto placebo", e rispondendo assai efficacemente ad agopuntura (Chiu et al., 2003).

# 3. INDIVIDUAZIONE DEI PUNTI DI AGOPUNTURA NEL RATTO ATTRAVERSO MISURE DI RESISTENZA ELETTRICA CUTANEA

Sono stati utilizzati ratti femmine adulte CD Sprague Dawley (Charles River, Calco, Lecco, Italia), pathogen-free, di peso compreso tra 250-275 gr all'inizio degli esperimenti e ratti maschi adulti CD Sprague Dawley (Charles River, Calco, Lecco, Italia), pathogen-free, di 250-275 g. Gli animali sono stati stabulati in gabbie di polipropilene con cibo ed acqua ad libitum, con un ritmo luce-buio di 12 ore (luce ore 7, buio ore 19). Gli

animali sono stati maneggiati giornalmente per una settimana per minimizzare lo stress prima dei test sperimentali. Tutte le osservazioni e i test sono stati eseguiti tra le 9.00 e le 12.00.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con le direttive dell'European Community Council del 24 Novembre del 1986 (86/609/EEC) e approvati dal Consiglio Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna e dal MIUR. Tutte le misure algesiometriche sono state condotte nel rispetto delle linee guida etiche sancite dall'International Association for the Study of Pain (IASP) (Zimmermann, 1983).

# 3.1 Scelta dei punti

Abbiamo scelto 5 punti tra i più frequentemente utilizzati nella letteratura scientifica: St 36 Zu San Li, Bl 40 Wei Zhong, Bl 60 Kun Lun, Ki 1 Yong Quan, Th 5 Wai Guan. Questi punti includono zone glabre (Th 5, Ki 1 e Bl 60) e zone ricoperte da pelo (St 36 e Bl 40). FIG1

Per identificare gli agopunti nel ratto, si è usato un cercapunti ad uso commerciale modificato affinchè l'elettrodo di riferimento potesse essere applicato a livello di superficie dorsale della coda del ratto (Pointer Plus and Digital Multimeter ST 5500, Tens Plus Ind. CO, Hong Kong, China). La punta del cercapunti è sferica (diametro =3mm) e retraibile in modo da non danneggiare la cute in eventuali anche minimi spostamenti per trovare il punto. Il cercapunti misura le variazioni di resistenza elettrica in un punto della cute rispetto all'elettrodo di riferimento emettendo un segnale luminoso ed acustico di intensità direttamente proporzionale alla variazione di resistenza. I valori di frequenza acustica (Hz) sono stati convertiti in valori di resistenza elettrica (ohm), utilizzando una scala standard generata dalla correlazione tra valori noti di resistenza e rispettive misurazioni di

frequenza, in accordo con la seguente formula matematica:  $y = 3,4829x^2 - 74,242x + 448,68$  and  $R^2 = 0.9983$ .

# 3.2 Procedura sperimentale

Per minimizzare lo stress, prima di procedere con i test abbiamo eseguito un training sugli animali per 5 giorni consecutivi.

Ogni gruppo era composto da 5 animali.

Il cercapunti è stato posizionato sul punto selezionato per pochi secondi in modo da stabilizzare il segnale. Nell'ordine di testare la variabilità intra-laboratorio, inter-animale, nonchè la variabilità dettata dai ritmi circadiani, sono state effettuate 3 misure consecutive, bilateralmente a tre diversi orari della giornata (9.00, 13.00 e 17.00) per 5 giorni consecutivi. Abbiamo inoltre testato l'effetto di diversi tipi di anestesia (etere, pentobarbital (60 mg/kg ip) e ketamina (10mg/kg ip)) sulla resistenza elettrica cutanea nel punto di agopuntura.

#### 3.3 Risultati

Nell'umano i valori normali di resistenza elettrica crollano a livello di agopunto (Cho and Chun, 1994; Ahn et al., 2005). Questo è stato confermato nel ratto utilizzando il nostro metodo. Abbiamo misurato i valori di frequenza nei punti selezionati comparandoli con punti adiacenti non specifici verificando una risposta tutto-niente (Fig 2). Abbiamo inoltre osservato come il segnale rimanga stabile nel tempo mantenendo il cercapunti sul punto e, viceversa, di come il segnale scompaia muovendo la cute o il tessuto sottocutaneo. Questa è una osservazione di particolare rilevanza nel ratto, data la particolare abbondanza di connettivo sottocutaneo presente in questa specie. Abbiamo effettuato 3 misure

bilaterali in tempi differenti (9.00, 13.00 and 17.00) dello stesso giorno, e la media ottenuta nei 5 punti osservati sono riportati in Fig 3. Il valore più alto è stato misurato in St 36, il più basso in Bl 60. nessuna variazione circadiana è stata osservata nelle misurazioni effetuate su ciascun punto. La vaiabilità intra-laboratorio è stata valutata misurando il punto ST 36 nella gamba sinistra (L) e destra (R), ogni giorno per 5 giorni consecutivi, da differenti operatori. Come mostrato in figura 3 le misure mostrano una variabilità intorno al 10%. Gli effetti degli anestetici sui valori di resistenza elettrica cutanea sono riportati in FIG 4 dove il pannello A si riferisce al pentobarbital, B ad etere, C e D a ketamina. Sono stati studiati tre punti KI 1, TH 5 and ST 36, sia a sinistra (L) che a destra (R) in animali svegli (-) ed anestetizzati (+). Nessuna differenza è stata osservata nei ratti sottoposti ad anestesia con pentobarbital.

Si è invece registrato un evidente drop nel gruppo anestetizzato con etere e ketamina nel punto KI1, individuato nel centro della faccia plantare della zampa posteriore. I valori di resistenza inoltre sono fortemente dipendenti dalla profondità dell'anestesia. In Fig. 4D è mostrato come il segnale scompaia progressivamente con la perdita di coscienza dell'animale per poi riapparire al risveglio completo del soggetto.

#### 3.4 Discussione

La resistenza cutanea viene considerate un metodo valido per il rilevamento dei punti di agopuntura, essendo noto da tempo che il punto di agopuntura è caratterizzato da un drop delle resistenza elettrica cutanea rispetto ad una area adiacente non specifica. (Kawakita et al., 1991; Cho and Chun, 1994; Ahn et al., 2005). Questo assunto infatti è alla base dei normali cercaounti reperibili in commercio. In particolare, il metodo

proporzionale (il sistema di misura dei *cun* ) è considerato il migliore per l'uso su uomo ed animali di taglia superiore al ratto ed al topo per evidenti problemi di proporzioni delle parti anatomiche di questi animali. I nostril dati conermano una corrispondenza tra uomo e ratto nella posizione dei punti I agopuntura oservati e ciò suggerisce un semplice credibile e riproducibile metodo per la individuazione dei punti nella routine del lavoro in laboratorio. Abbiamo inoltre indicato che nel disegno sperimentale devono essere considerati altri parametri, come i momenti della giornata in cui effettuare i test e la presenza o assenza di animali sedati o sottoposti ad anestesia. Proprio questa ultima parte apre una nuova discussione, legata ad eventuali *drop* delle resistenze elettriche cutanee anestesia-indotti, con risposte diverse in base anche al tipo di anestetico utilizzato. Non abbiamo ancora trovato risposte a questa domanda anche se altri studi dimostrano come differenti tipi di anestesia, e.g. epidurale e sistemica, nonchè differenti farmaci, e.g. bupivacaina, mepivacaina, scopolamina, modificano le risposte elettriche cutanee, laddove il pentobarbital non lo fà registrare. (Orikasa et al., 1992; Malmqvist et al., 1992). Possiamo inoltre ricordare le già menzionate caratteristiche elettriche della cute nel punto di agopuntura, le quali possono mediare differenti risposte biochimiche (Langevin and Yandow, 2002; Lee et al., 2004).

Molti e complessi studi stanno cercando di costruire un ponte tra la Medicina Tradizionale Cinese e la Scienza Occidentale nell'ordine di provvedere con dati sperimentali a supportare l'uso dell'agopuntura in clinica umana e veterinaria. Sicuramente la standardizzazione dei protocolli sperimentali nell'animale da laboratorio è uno step critico in questo processo.

### 4. LASER-PUNTURA IN DUE MODELLI DI DOLORE ACUTO

#### 4.1 Trattamento laser

È stato utilizzato un "very low-power" laser (brevetto BIOLITE, RGM, Genova, Italy,).

I dati fisici della stimolazione laser sono i seguenti:

- Emissione luce rossa: λ=670nm
- Potenza del picco: 3 mW
- Modulazione principale onda quadra: f=100Hz, Duty Cycle= 1%
- Modulazione secondaria (manuale): f=1Hz, Duty Cycle=50%
- Potenza media: 0,015 mW (quella dei laser terapeutici normalmente utilizzati è nell'ordine di qualche decina di mW)
- Energia di stimolazione del punto < 0,075 mJ (quella utilizzata nelle stimolazioni agopunturali è nell'ordine di 1 J)
- Superficie dello spot (sezione del fascio): 5mm<sup>2</sup>
- Densità di potenza (fluenza): 0,3 mW/cm<sup>2</sup>
- Densità energetica: 1,5 mJ/cm<sup>2</sup>

Per gli esperimenti in fase acuta, il laser è stato applicato nel ratto in due punti corrispondenti a ST36, a livello della depressione antero-inferiore della testa della fibula e l'altro, TH5, 2 cun sopra il punto medio della piega di flessione del polso, tra radio e ulna, bilateralmente, o direttamente sulla superficie dorsale degli arti posteriori degli animali delicatamente trattenuti. Sono stati scelti modelli animali di uso corrente nella letteratura scientifica, con l'obiettivo di avere modelli senza apprezzabili alterazioni anatomo-patologiche. La stimolazione laser utilizza punti così detti "generali" di agopuntura, come descritti in base a mappe correlative uomoratto. Durata e frequenza della stimolazione, così come le caratteristiche di

pulsatilità, sono stabilite in relazione all'efficacia clinica su soggetti umani in patologie assimilabili a quelle sperimentalmente indotte (Baratto et al., 2000). In accordo con la medicina tradizionale cinese, questi punti che si trovano sui meridiani SJ (SanJiao) e GB (Gall Bladder) sono uniti nel formare il livello energetico ShaoYang.

# 4.2 Modelli Sperimentali

# 4.2.1 Infiammazione Acuta Plantare

L'infiammazione è stata indotta nei ratti femmina, previa anestesia con etere, con una somministrazione intradermica sotto la pianta del piede destro di 150µl di Carragenina al 0.5% (Sigma, St. Louis, MO, USA) in soluzione fisiologica sterile. L'ago è stato inserito nella zona glabra della regione plantare e fatto avanzare di 6 – 8 mm prossimalmente verso la regione del tarso. Il progredire dell'edema e quindi il volume della zampa ipsi- e controlaterale è stato misurato in triplicato mediante un Pletismometro (Ugo Basile, Italia). Quest'ultimo è un strumento in grado di determinare il volume di una zampa basandosi sul principio di Archimede; è costituito da una cella nella quale è contenuta acqua ad una temperatura di circa 37°C e un trasduttore in grado di determinare la variazione del volume di acqua nella cella. Lo strumento è stato tarato ad ogni utilizzo mediante gli appositi standard a volumi noti. L'arto posteriore degli animali è stato immerso fino all'altezza del calcagno nella cella. Sono stati raccolti tre valori per ciascuno degli arti posteriori per ciascun animale ed è stato calcolato il valore medio delle 3 misure.

La misura del volume precedente all'iniezione di carragenina è stata utilizzata come controllo. I dati sono stati presi in considerazione sia come

valore assoluto (volume, ml), sia come variazione del volume dell'arto infiammato rispetto al valore dell'arto controlaterale di controllo per ciascun *time point*. L'edema è stato valutato a 250, 300, 500 e 750 min. dall'iniezione di carragenina.

Il laser è stato applicato ad ogni time point immediatamente dopo la misurazione dell'edema. Studi comportamentali precedenti riportano la comparsa di iperalgesia da 2 ore dopo l'iniezione di carragenina fino ad un massimo di 96 ore successive all'iniezione (Kaiser and Guilbaud, 1987).

L'effetto del laser sulla soglia del dolore per stimoli termici è stato misurato utilizzando il "Plantar test".

Il Plantar Test (UGO BASILE, Italy) è uno strumento costituito da compartimenti di plexiglass, al di sotto dei quali si posiziona un generatore di infrarossi mobile in grado di determinare calore in un punto specifico con un fascio puntiforme. L'intensità della sorgente luminosa viene calibrata in modo da indurre la retrazione della zampa irradiata in 8-10s in animali sani. Prima del test i ratti sono stati posti negli scomparti di plexiglass e lasciati ambientare per 10 min. Il test consiste nel valutare il tempo, calcolato in secondi, impiegato dall'animale libero di muoversi a sollevare la zampa dal momento in cui viene applicato lo stimolo termico. È possibile calcolare il tempo di reazione grazie ad una fotocellula connessa ad un timer digitale.

È stato fissato un tempo massimo di 20 sec. come limite per l'esposizione al calore per evitare possibili danni tissutali alla zampa.

# 4.2.2 Dolore miofasciale

L'infiammazione è stata indotta nei ratti maschi Sprague Dawley (Charles River, Varese, Italy), previa anestesia con Etere, con una somministrazione

intramuscolo a livello di ventre del tricipite brachiale bilateralmente di 4 mg di Carragenina sospesa in 150µl di PBS per tricipite (Sigma, St. Louis, MO, USA). Gli animali sono stati testati prima (t0), a 3 (t3) e 6 ore (t6) dopo l'iniezione (Kehl et al., 2000). Le misurazioni della forza degli arti anteriori è stata effettuata utilizzato un "grip force meter" che misura la performance neuromuscolare in risposta alla forza di trazione dell'animale su una griglia, da un minimo di 0 ad un massimo di 500 g (made by RGM, Genova, Italy) (Kehl et al., 2000). La macchina è composta da una griglia meccanica a cui l'animale viene fatto aggrappare con le zampe anteriori, questa è collegata ad un ago che trasmette la forza di trazione che l'animale esercita. L'ago converte quindi la forza impressa dall'animale sulla griglia in un segnale digitale registrato dal software dell'attrezzatura. La durata e l'intensità dello sforzo è determinata dall'animale stesso. Al contrario, l'ampiezza e la durata dello sforzo sono soggette a diversi fattori, come l'iperalgesia, che influenzano la performance comportamentale dell'animale (Kehl et al., 2000; Anderson et al., 2004). Per la statistica è stato utilizzato il punto di massima intensità dello sforzo prima che l'animale lasci la barra.

Il trattamento con il laser è stato effettuato tre ore dopo l'iniezione con carragenina e gli animali sono stati testati 10 minuti dopo la fine dell'applicazione laser.

Il test è stato ripetuto 6 ore dopo l'iniezione.

Per effettuare questo test gli animali vengono gentilmente posti davanti alla griglia metallica connessa al trasduttore e quindi leggermente tirati in direzione rostro-caudale. Per riflesso l'animale tende ad attaccarsi alla griglia e a fare forza per scappare in direzione opposta. Questo sforzo dura pochi secondi e la sua intensità espressa in grammi viene registrata dal software.

#### **4.3 RISULTATI**

# 4.3.1 Infiammazione plantare

L'iniezione di carragenina nella pianta del piede induce un'edema rapido e progressivo che raggiunge il suo massimo sviluppo a 300 min. dall'iniezione e che si risolve in 24 ore (Fig 5). Gli animali trattati con una singola applicazione del laser presentano un andamento dell'edema significativamente inferiore ai controlli non trattati.

Una singola applicazione del laser nei punti di agopuntura induce una rapida riduzione dell'edema tanto che il volume dell'arto posteriore misurato 5 min. dopo l'applicazione del laser può essere sovrapponibile a quello dell'arto non trattato (Fig 6).

L'effetto non si è verificato per applicazioni laser effettuate non nei punti di agopuntura, ma direttamente sul dorso del piede.

È stata poi testata la soglia per la sensibilità termica in animali liberi di muoversi, 500 min. dopo l'iniezione di carragenina, cioè nella fase di massimo edema. Gli animali hanno sviluppato un'iperalgesia tradottasi in una diminuzione pari al 25% del tempo di retrazione dell'arto posteriore allo stimolo termico (Fig 7).

Una singola applicazione del laser induce in una completa risoluzione dell'iperalgesia termica.

# 4.3.2 Dolore miofasciale

Come illustrato in Fig 8, l'iniezione di carragenina riduce sensibilmente la performance dell'animale non trattato. Il trattamento di laser-puntura è stato effettuato al picco dell'infiammazione (3 ore post-iniezione di

carragenina) e le misure sono state effettuate 10 min dopo la fine dell'applicazione laser.

L'applicazione del laser pulsato sembrerebbe migliorare la performance neuromuscolare dei ratti. (Student's t test, \*p<0.5; \*\*\*<0.0001)

# 5. DISCUSSIONE

Questa sperimentazione si prefiggeva di:

- 1. Validare l'utilizzo di misure di resistenza elettrica cutanea per la rilevazione del punto di agopuntura nel ratto permettendo una standardizzazione e quindi riproducibilità dei dati ottenuti.
- 2. trovare conferma dell'effetto antiedemigeno e antidolorifico del laser pulsato a bassissima energia Biolite in modelli sperimentali convalidati, non suscettibili di effetto placebo;
- Le attuali ipotesi di lavoro relative ai possibili meccanismi d'azione della luce laser, distinguono meccanismi primari e meccanismi secondari (Fig.

3. validare l'uso di agopunti per l'applicazione del vLLL;

17) (Tuner e Hode, 2002). I primari fanno esplicito riferimento alla creazione di dipoli elettrici attraverso le membrane plasmatiche: questi innescherebbero una catena di diversi meccanismi intracellulari e sistemici che sono alla base dei principali effetti terapeutici attribuiti al laser a bassa e bassissima energia: riparazione tissutale, interferenza con i processi infiammatori, interferenza con la trasmissione del dolore.

Il laser emette una luce rossa, che è la più indicata per penetrare i tessuti biologici, dal momento che sfrutta la contemporanea presenza di due "finestre" di maggior trasparenza sia dell'acqua che dell'emoglobina, ma il fascio laser subisce attenuazione e divergenze all'attraversamento del

tessuto secondo modelli complessi e fortemente dipendenti dalle caratteristiche del tessuto sul quale incide. Per approssimazione si può comunque ritenere che la attenuazione prodotta dalla cute incida per oltre il 90% e che quindi, data la densità di potenza incidente di 0,3 mW/cm², alla matrice extracellulare arrivi al massimo una densità di potenza di 0,03 mW/cm².

Con la nostra sperimentazione abbiamo dimostrato nel ratto un effetto antiedema prodotto dall'applicazione di vLLLT nei punti di agopuntura in corso di infiammazione indotta dall'iniezione plantare di carragenina e la completa risoluzione dell'iperalgesia termica misurata con il test di irradiazione plantare. Il laser si è dimostrato inoltre efficace anche nel migliorare la performance neuromuscolare in animali sottoposti ad un modello di dolore miofasciale ottenuto tramite iniezione di carragenina a livello di tricipiti brachiali.

Il laser è efficace se applicato ai punti di agopuntura mentre risulta essere inefficace se applicato localmente. Come già ricordato, i punti di agopuntura presentano una serie di caratteristiche anatomo-funzionali assai dissimili rispetto al sottocute circostante. Nel ratto è stato dimostrato che si verifica una diminuzione del dolore e dell'edema successivi ad un'infiammazione acuta e all'artrite sia con l'applicazione dell'ago nel punto di agopuntura, che la sua sola stimolazione ad esempio elettrica transcutanea (Wang et al., 1992), o con veleno d'ape (Kwon et al., 2001), con elettro-agopuntura (Ceccherelli et al., 1999, Lin et al., 1998). Lo stesso trattamento applicato al di fuori degli agopunti è stato trovato inefficace nel ridurre dolore ed edema.

Il laser inoltre, da precedenti esperienze di laboratorio, sembra molto meno efficace nel ridurre comportamenti indicatori di dolore quando questo è

sostenuto da alterazioni anatomiche: questo supporterebbe la teoria energetica dell'agopuntura.

Ci sono molti punti che possono essere discussi nel nostro protocollo di stimolazione. La densità di energia che noi applichiamo in ciascun trattamento è estremamente bassa. I bassi livelli energetici sono stati dimostrati efficaci nella Biologia del fibroblasto, aumentando la sintesi della crescita cellulare ma non nella sintesi del protocollagene (Pereira et al., 2002).

Questo effetto è selettivo per le più basse energie testate (3J/cm2) e non presente a 5. Questo offre una nuova, possibile finestra sulla ricerca di effettori biologici per gli impulsi dei vLLL. Essendo la profondità di penetrazione di laser infrarossi a bassa energia stimata in pochi millimetri (Kayser and Guilbaud, 1987).

Noi possiamo ipotizzare che vLLLT applicate a punti di agopuntura alteri semplicemente l'ambiente fisico-chimico agendo sulle cariche ioniche presenti nella "bundle" neuro-vascolare. L'alterazione della distribuzione di cariche così indotta potrebbe investire anche i terminali nervosi liberi, agendo sia sulla componente algica che sul riflesso assonale che sostiene la neuro infiammazione. Infatti è stato descritto come l'irradiazione prodotta dal laser pulsato avente una densità energetica nel range di 0,05-2,5 J/cm² a 4-128Hz non generi effetti diretti sui potenziali d'azione e sulla velocità di conduzione nel nervo sciatico isolato da una rana (Bagis et al., 2002).

Nella pratica clinica sia l'agopuntura tradizionale che l'elettroagopuntura sono utilizzati per indurre analgesia, sia localmente che in aree estese del corpo (Kaanda and Eielsen, 1983; Ueda and Shimizu, 2001) ed è comunemente accettato che l'agopuntura sia efficace anche nel trattamento di diverse forme di dolore infiammatorio ed artrite (Andersson and Lundeberg, 1995; NIH, 1997).

Le irradiazioni pulsate si sono mostrate più efficaci nello stimolare effetti biologici rispetto alle continue e anche la degranulazione dei mastociti indotta da elettroagopuntura è dipendente dalla frequenza pulsata (el Sayed and Dyson, 2001).

#### 6. BIBLIOGRAFIA

- 1. Ahn CA, Wu J Badger GJ, Hammerschlag R, Langevin HM. Electrical impedance along connective tissue planes associated with acupuncture meridians. BMC Complementary and Alternative Medicine, 9:5-10, 2005
- 2. Andersson S., Lundeberg T. Acupuncture-from empiricism to science: functional background to acupuncture effects in pain and desease. Med. Hyphoth. 45:271-281, 1995.
- 3. Bagis S., Comelekoglu U., Sahin G., Buyukakilly B., Erdogan C., Kanik A. Acute electrophisiologic effect of pulsed gallium-arsenide low laser energy irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. Lasers Surg. Med. 30:376-380, 2002.
- 4. Baratto L., Capra R., Farinelli M., Monteforte P., Marasso P., Rovetta G. A new type of very low-power modulated laser: soft-tissue changes induced in osteoarthritic patients revealed by sonography. Int. J. Clin. Pharmacol. Res. 20:13-16, 2000.
- 5. Bergsman O., Wooley-Hart A. Differences in electrical skin conductivity between acupuncture points and adjacent skin areas. Am. J. Acupuncture 1:27-32, 1973.
- 6. Biella G., Sotgiu M.L., Pellegata G., Paulesu E., Castiglioni I., Fazio F. Acupuncture produces central activations in apin regions. Neuroimage 14:60-66, 2001.
- 7. Bossy J. (Ed.) Basi neurobiologiche delle riflessoterapie. Masson Edit., 1977.
- 8. Bossy J. Morphological data concerning the acupuncture points and channel network. Acupunct. Electrother. Res. 9:79-106, 1984.
- 9. Brosseau L., Welch V., Wells G., Tugwell P., de Bie R., Gam A., Harman K., Shea B., Morin M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arhtritis: a metaanalysis. J. Rheumatol. 27:1961-1969, 2000.

- 10.Brosseau L., Welch V., Wells G., de Bie R., Gam A., Harman K., Morin M., Shea B., Tugwell P. Low level laser therapy (Classes I, II and III) for treating osteoarthritis. Cochrane Database Syst. Rev. 3:CD002046, 2004.
- 11.Cai W. Acupuncture and the nervous system. Am. J. Chin. Med. 20:331-337, 1992.
- 12. Ceccherelli F., Gagliardi G., Matterazzo G., Visentin R., Giron G. The role of manual acupuncture and morphine administration on the modulation of capsaicin-induced edema in rat paw. A blind controlled study. Acupunct. Electrother. Res. 21:7-14, 1996.
- 13. Cheng X.D., Wu G.C., He Q.Z., Coo X.D. Effect of continued electroacupuncture on induction of interleukin-2 production of spleen lymphocytes from the injured rats. Acupunct. Electrother. Res. 22:1-8, 1997.
- 14. Chiu J.H., Chung M.S., Cheng H.C., Yeh T.C., Hsieh J.C., Chang C.Y., Kuo W.Y., Cheng H., Ho L.T. Different central manifestations in response to electroacupuncture at analgesic and nonanalgesic acupoints in rats: a manganese-enhanced functional magnetic resonance imaging study. Can. J. Vet. Res. 67:94-101, 2003.
- 15.Cho SH, Chun SI. The basal electrical skin resistance of acupuncture points in normal subjects. Yonsei Medical Journal. 35:464-74, 1994
- 16.Cho Z.H., Chung S.C., Jones J.P., Park J.B., Park H.J., Lee H.J., Wong E.K., Min B.I. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2670-2673, 1998.
- 17. Chusid J.G. (Ed.) Correlative Neuroanatomy and Functional Neurology, 18<sup>th</sup> ed., Lange Medical Publ., Los Altos, CA, USA, 1982.
- 18.Dale R.A. (Ed.) Demythologizing Acupuncture. Part 1. The Scientific Mechanisms and the Clinical Uses. Alternative Complementary Ther. J. 3:125-131, 1997.
- 19.de Vernejoul P., Albarede P., Darras J.C. Nuclear medicine and acupuncture message transmission. J. Nucl. Med. 33:409-412, 1992.

- 20.Duncan G. (Ed.) Fisica per Scienze Biomediche, Casa Editrice Ambrosiana, Milano 1998.
- 21. Dundee J.W., Ghaly G. Local anesthesia blocks the antiemetic action of P6 acupuncture. Clin. Pharmacol. Ther. 50:78-80, 1991.
- 22.Richardson J.D., Vasko M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. Pharmacol. Exp. Ther. 302:839-845, 2002.
- 23.el Sayed S.O., Dyson M. Effects of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. Laser Surg. Med. 19:433-437, 2001.
- 24.Enwemeka C. Depth of low intensity helium-neon and gallium-arsenide laser through rabbit dermal and subdermal tissues. Laser Therapy 12:22-30, 2001.
- 25.Ernst M., Lee M.H., Sympathetic effects of manual and electrical acupuncture of the tsusanli knee point: comparison with the Hoku handpoint sympathetic effects, Exp. Neurol. 94:1-10, 1986.
- 26.Ezzo J., Berman B., Hadhazy V.A., Jadad A.R., Lao L., Singh B.B. Is acupuncture effective for the treatment of chronic pain? A systematic review. Pain 86:217-225, 2000.
- 27.Fang T.L., Krings T., Weidemann T., Meister I.G., Thron A. Functional MRI in healthy subjects during acupuncture: different effects of needle rotation in real and false acupoint. Neuroradiology 46:359-362, 2004.
- 28. Giamberardino M.A. Referred muscle pain/hyperalgesia and central sensibilisation. Reabhil. Med. 41:85-88, 2003.
- 29. Giuliani A., Fernandez M., Giardino L., Farinelli M., Baratto L., Capra R., Calzà L. Stimolazioni periferiche per il controllo del dolore. Suggestioni, elementi di consenso, ipotesi di lavoro. Pathos 10:114-118, 2003.
- 30.Han J-S., J. Tang, Ren M.F., Zhou Z.F., Fan S.G., Qiu X.C. Central neurotransmitters and acupuncture analgesia. Am. J. Chin. Med. 8:331-348, 1980.

- 31.Han J-S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. Trends Neurosci. 26:17-22, 2003.
- 32.Han J-S. Acupuncture and endorphins. Neurosci. Lett. 361:258-261, 2004.
- 33.Hao S., Takahata O., Iwasaki H. Electroacupuncture potentiates the antinociceptive effect of intrathecal endomorphin-1 in the rat formalin test. Neurosci. Lett. 287:9-12, 2000.
- 34.He L.F. Involvement of endogenous opioid peptides in acupuncture analgesia. Pain 31:99-121, 1987.
- 35.Heine H. Anatomical structure of acupoints. J. Tradit. Chin. Med. 8:207-212, 1988.
- 36.Jeong H.J., Hong S.H., Nam Y.C., Yang H.S., Lyu Y.S., Baek S.H., Lee H.J., Kim H.M. The effect of acupuncture on proinflammatory cytokine production in patients with chronic headache: a preliminary report. Am. J. Chin. Med. 31:945-954, 2003.
- 37.Kaada B., Eielsen O. In search of mediators of skin vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation: II. Serotonin implicated. Gen. Pharmacol. 14:635-641, 1983.
- 38.Kashiba H., Ueda Y. Acupuncture to the skin induces release of substances P and calcitonin gene-related peptide from peripheral terminals of primary sensory neurons in the rat. Am. J. Chin. Med. 19:189-197, 1991.
- 39.Kayser V., Guilbaud G. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. Pain 28:99-103, 1987.
- 40.Kawakita K, Kawamura H, Keio H, Hongo T, Kitakohji H. Development of the low impedence points in the auricolar skin of experimental peritonitis rats. The American journal of Chinese medicine, 19:199-205, 1991.
- 41.Kenins P. Identification of the unmyelinated sensory nerves which evoke plasma extravasation in response to antidromic stimulation. Neurosci. Lett. 25:137-141, 1981.

- 42.Kwon Y.B., Lee J.D., Lee H.J., Han H.J., Mar W.C., Kang S.K., Beitz A.J., Lee J.H. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain 90:271-280, 2001.
- 43.Langevin HM, Yandow JA. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes. The Anatomical record, 269, 257-65, 2002.
- 44.Lee MS, Kim YC, Moon SR, Shin BC, Jeong DM. Hydrodynamic analysis of waveforms induced by vibrational stimuli at meridian and non-meridian points. 2004
- 45.Lee J.H., Beitz A.J. The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. Pain 52:11-28, 1993.
- 46.Li A.-H., Zhang J.-M., Xie Y.-K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. Brain Res. 1012:154-159, 2004.
- 47.Li G., Huang L., Cheung R.T., Liu S.R., Ma Q.Y., Yang E.S. Cortical activations upon stimulation of the sensorimotor-implicated acupoints. Magn. Reson. Imaging. 22:639-644, 2004.
- 48.Lo S.-Y. Meridians in acupuncture and infrared imaging. Med. Hypotheses 58:72-76, 2002.
- 49.Lu G.W. Characteristics of afferent fiber innervation on acupuncture points Zusanli. Am. J. Physiol. 245:606-612, 1983.
- 50.Lubart R., Malik Z., Rochkind S. and Fisher T. A possible mechanism of low level laser-living cell interaction. Laser Therapy 2:65-68, 1990.
- 51.Ma W., Tong H., Xu W., Hu J., Liu N., Li H., Cao L. Perivascular space: Possibile anatomical substrate for the meridian. J. Alternative Complementary Med. 9:851-859, 2003.
- 52. Maciocia G. (Ed.) La clinica in Medicina Cinese, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1995.
- 53.Malmqvist EL, Berg S, Holmgren H, Rutberg H, Bergtsson M. Effects of epidural bupivacaine or mepivacaine on somatosensory

- evoked potentials and skin resistance responces. Reg Anesth, 17, 205-211, 1992.
- 54.Monteforte P., Baratto L., Molfetta L., Rovetta G. Low-power laser in osteoarthritis of the cervical spine. Int. J. Tissue React. 25:131-136, 2003.
- 55.Nayak S., Matheis R.J., Agostinelli S., Shifleft S.C. The use of complementary and alternative therapies for chronic pain following spinal cord injury: a pilot survey. J. Spinal Cord Med. 24:54-62, 2001.
- 56.NIH, Consensus Statements: 107, Acupunture, http://consensus.nih.gov/cons/107/107\_statements.htm, 1997
- 57.Orikasa S, Saito M, Kawashima T. Effect of scopolamine on the electrical resistance of the paw pads of mice. Pharmacol Biochem Behav, 41:855-857, 1992.
- 58.Pereira A.N., Eduardo C.deP., Matson E., Marques M.M. Effects of low-power laser irradiation on cell growth and protocollagen synthesis of cultured fibroblast. Laser Surg. Med. 31:263-267, 2002.
- 59.Roccia L., Panichi M. (Eds.) Atlante Anatomico di Agopuntura Veterinaria, Edizioni Minerva Medica, 1978.
- 60. Schmela M, Petersen L.T. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. News Physiol. Sci. 16:33-37, 2001.
- 61. Schoen A.M. (Ed.), Veterinary Acupuncture-Ancient Art to Modern Medicine- Mosby, N.Y., USA, 1994.
- 62. Steinhoff M., Stonder S., Seeliger S., Ansel J.C., Schmeltz H., Luger T. Modern aspetcs of cutaneous neurogenic inflammation. Arch. Dermatol. 139:1479-1488, 2003.
- 63. Takeshige C. (Ed.) Mechanism of Acupuncture Analgesia Based on Animal Experiments. Scientific Bases of Acupunctur, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
- 64. Takeshige C., Oka K., Mizuno T., Hisamitsu T., Luo C.P., Kobori M., Mera H., Fang T.Q. The acupuncture point and its connecting central pathway for producing acupuncture analgesia. Brain Res. Bull. 30:53-67, 1993.

- 65. Takeshige C. and Sato M. Comparisons of pain relief mechanisms between needling to the muscle, static magnetic field, external qigong and needling to the acupuncture point, Acupunct. Electrother. Res. 21:119-131, 1996.
- 66. Tuner J., Hode L. (Eds.) Laser Therapy Clinical Practice and Scientific Background, Prima Books AB, 2002.
- 67.Ueda Y., Shimizu N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. J. Oral Sci. 43:55-60, 2001.
- 68. Vo-Dinh T. (Ed.) Biomedical Photonics Handbook, CRC Press, 2003.
- 69.Zhang W.-T, Jin Z., Cui G.-H, Zhang K.-L, Zhang G.L., Zheng Y.W., Luo F. Chen A.C.N., Han J.-S. Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs high frequency electrical acupoint stimulation in different subject: a functional magnetic resonance imaging study. Brain Res. 982:168-178, 2003.
- 70.Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16:109, 1983.
- 71. Wang J.Q., Mao L., Han J.S. Comparison of the antinociceptive effects induced by electroacupunture and transcutaneous electrical nerve stimulation in the rat. Int. J. Neurosci. 65:117-129, 1992.
- 72. Wu M.T., Sheen J.M., Chuang K.M., Yang P., Chin S.L., Tsai C.Y., Chen C.T., Liao J.R., Lai P-H, Chu K-A, Pan H-B, Yang C-F. Neuronal specificity of acupuncture response: a fMri study with electroacupuncture. Neuroimage 16:1028-1037, 2002.
- 73. Wyon Y., Hammar M., Theodorsson E., Lundberg T. Effects of physical activity and acupuncture on calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in different parts of the rat brain and in cerebrospinal fluid, serum and urine. Acta Physiol. Scand. 162:517-522, 1998.
- 74. Yu Y., Kasahara T., Sato T., Guo S.Y., Liu Y., Asano K., Hisamitsu T. Enhancement of splenic interferon-gamma, interleukin-2, and NK

cytotoxicity by S36 acupoint acupuncture in F344 rats. Jpn. J. Physiol. 47:173-178, 1997.

75.www.iasp-pain.org/terms-p.html

76.www.science.unitn.it/~mostre/Laser.html.